



MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2012/2013

Role of adrenaline on the maturation of adrenoceptors

Mónica Isa Moreira Rodrigues

Área: Fisiologia e Farmacologia

Trabalho efetuado sob orientação de:

Professor Doutor Daniel Moura

E sob coorientação de:

Professor Doutor Paulo Correia de Sá

Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:

British Journal of Pharmacology

Dedicatória

Ao meu marido Paulo, à minha filha Iara, aos meus pais e ao meu irmão.

O que escuto esqueço; o que vejo lembro; o que faço aprendo.

Confúcio (551-479 A. C.)

Agradecimentos

Fazer esta tese foi um árduo percurso de desenvolvimento científico e pessoal, que só foi possível com o contributo de muitas pessoas a quem agradeço:

- Ao Professor Doutor Daniel Moura, meu orientador, pelos muitos ensinamentos e apoio e pelas condições científicas que me deu para desenvolver este projeto.
- Ao Professor Doutor Paulo Correia de Sá, meu coorientador e Diretor do Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia do ICBAS, pelo seu incentivo e a quem estou muito grata pelo contributo decisivo para o meu futuro profissional.
- Ao Professor Doutor Patrício Soares da Silva, Diretor do Departamento de Farmacologia e Terapêutica da FMUP, que permitiu a realização do meu projeto naquela Instituição e pela gentileza com que sempre me tratou.
- Às Engenheiras Paula Serrão e Joana Afonso, do Departamento de Farmacologia e Terapêutica da FMUP, pelo apoio laboratorial imprescindível, pela disponibilidade incondicional e pela amizade.
- A todos os investigadores e funcionários do Departamento de Farmacologia e Terapêutica da FMUP e do Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia do ICBAS pela forma carinhosa como me acolheram.
- Por último, aos meus familiares e amigos que sempre me apoiaram e encorajaram. Ao meu marido Paulo pelo seu apoio e compreensão. À minha filha Iara pela sua alegria, que muito enriqueceu a minha vida. Aos meus pais pelo seu entusiasmo e estímulo nas minhas atividades académicas. Ao meu irmão por me apoiar na persecução dos meus objetivos. Aos meus sogros pelo seu carinho, compreensão e ajuda.

Índice

Resumo	1
Manuscript for submission to British Journal of Pharmacology	9
Summary.....	10
Introduction	12
Material and Methods.....	14
Results	18
Discussion and Conclusions	20
Acknowledgements	25
References	26
Table 1	31
Table 2	32
Table 3	33
Figure legends	34
Figure 1	36
Figure 2	37
Figure 3	38
Figure 4	39
Figure 5	40
Figure 6	41
Statement of conflicts of interest	42
Manuscripts published in scientific journals	45

Resumo

Antecedentes e finalidade: A ativação dos adrenoreceptores β pelas catecolaminas endógenas, adrenalina e noradrenalina, estimula a produção de AMP cíclico (AMPC) catalisada pela ciclase do adenilato por um processo que envolve proteínas G_s . A estimulação dos adrenoreceptores β periféricos pós-juncionais conduz ao relaxamento do músculo liso vascular, controlando desse modo a distribuição do sangue para os diferentes órgãos. Por outro lado, os adrenoreceptores β_2 pré-juncionais, presentes em neurónios simpáticos de muitos órgãos, facilitam a libertação de noradrenalina.

Contrariamente ao homem adulto, o recém-nascido possui concentrações plasmáticas de adrenalina inferiores às da noradrenalina. Por outro lado, em células sanguíneas humanas Thies *et al* encontraram uma resposta dos adrenoreceptores β à isoprenalina menor nos recém-nascidos do que nos adultos. Também se observou que os efeitos relaxantes da isoprenalina mediados por adrenoreceptores β estão ausentes na veia umbilical do recém-nascido humano. O mesmo já se tinha observado na veia safena de cães recém-nascidos, nos quais se verificou que a noradrenalina é a amina predominante na medula adrenal, enquanto nos adultos predomina a adrenalina. Na veia safena canina, Paiva e colaboradores observaram que o aumento pós-natal do teor de adrenalina na medula adrenal correlaciona-se no tempo com o aumento do relaxamento do músculo liso e com a facilitação da libertação de noradrenalina mediados pelos adrenoreceptores β_2 . Como a adrenalina é a única catecolamina que tem uma boa afinidade para os adrenoreceptores β_2 , sugeriu-se a existência de uma relação entre a concentração de adrenalina e o desenvolvimento de efeitos mediados pelos adrenoreceptores β_2 . No entanto, continua por demonstrar se o aparecimento dos efeitos mediados pelos adrenoreceptores β_2 é desencadeado diretamente pela adrenalina ou por outra causa que

desencadearia simultaneamente a produção de adrenalina e a maturação dos adrenoreceptores β_2 .

Neste contexto, considerou-se que o papel da adrenalina no desenvolvimento dos adrenoreceptores β_2 poderia ser elucidado de forma muito mais clara através da utilização de um modelo animal deficiente em adrenalina por inativação do gene da *N*-metiltransferase da feniletanolamina (PNMT). Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar o papel da adrenalina sobre o relaxamento e a facilitação da libertação de noradrenalina pelas extremidades nervosas simpáticas na aorta, mediados por adrenoreceptores β em ratos com o gene da PNMT inativado (PNMT-KO) e na estirpe selvagem.

Abordagem experimental: O modelo de rato (*Mus musculus*) PNMT-KO (PNMT- / -) foi originalmente concebido para avaliar a distribuição das células adrenérgica; para tal, o *locus* da PNMT foi inativado através da inserção da Cre-recombinase no exão 1. Com a finalidade de usarmos os ratos PNMT-KO nos nossos estudos estabelecemos uma colaboração com o professor Steven Ebert da Burnett School of Biomedical Sciences, da Universidade Central da Florida (USA). Os ratos PNMT-KO chegaram em abril de 2011 e reproduzem-se, desde então, normalmente no nosso biotério.

Os ratos PNMT-KO (129x1/SvJ, n = 40) e da estirpe selvagem (129x1/SvJ, n = 36) (8 a 12 semanas de idade) foram sacrificados por luxação cervical, sob anestesia (isoflurano a 100%, 200 μ L por inalação). A adrenalina e a noradrenalina presentes em amostras de plasma, da glândula suprarrenal e da aorta foram separadas por HPLC de fase inversa e quantificadas por deteção eletroquímica. As aortas foram dissecadas, e seccionadas em anéis que foram depois montados num miógrafo para a determinação de curvas de concentração-resposta para a isoprenalina (agonista dos adrenoreceptores β), a terbutalina

(agonista dos adrenoreceptores β_2) e a dobutamina (agonista dos adrenoreceptores β_1), na ausência ou na presença de ICI-118551 (antagonista dos adrenoreceptores β_2) ou de CGP 20712 A (antagonista dos adrenoreceptores β_1); as preparações foram pré-contraídas com fenilefrina (agonista dos adrenoreceptores α_1).

Paralelamente, realizaram-se experiências em aortas pré-incubadas com ^3H -noradrenalina e montadas em câmaras de perfusão. O efluxo de trítio do tecido foi induzido por estimulação elétrica na presença de concentrações crescentes de isoprenalina (agonista dos adrenoreceptores β) ou de terbutalina (agonista dos adrenoreceptores β_2). A expressão proteica dos adrenoreceptores β_2 foi avaliada em ambos os grupos de animais por “*western blot*” na aorta total e na sua porção membranar.

Os resultados são apresentados na forma de médias aritméticas \pm erro padrão da média (SEM) dos valores para o número indicado de determinações. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney e os valores do declive de Hill foram comparados pelo teste F. $p < 0,05$ foi considerado como diferença significativa.

Principais resultados: Confirmou-se ausência de adrenalina nas glândulas suprarrenais e no plasma dos animais PNMT-KO (Tabela 1). Não se observaram diferenças entre os dois grupos de animais na potência e na resposta relaxante máxima da aorta ao agonista dos adrenoreceptores β isoprenalina (Figura 1A; Tabela 2). No entanto, o ICI-118551 antagonizou o efeito da isoprenalina na estirpe selvagem mas não nos animais PNMT-KO; já o CGP 20712 antagonizou o efeito da isoprenalina em ambos os grupos de animais. A resposta máxima e a potência relaxante do agonista dos adrenoreceptores β_2 terbutalina foram menores nos ratos PNMT-KO do que na estirpe selvagem (Figura 1B; Tabela 2). O ICI-118551 antagonizou o efeito da terbutalina nos ratos da estirpe selvagem, mas não nos PNMT-KO (Figura 2). A potência e o efeito relaxante máximo

do agonista dos adrenoreceptores β_1 dobutamina foram idênticos nos dois grupos (Figura 1C; Tabela 2). O CGP 20712 antagonizou o efeito da dobutamina quer nos ratos da estirpe selvagem quer nos ratos PNMT-KO (Figura 3), sem diferenças entre os grupos no valor do seu pA_2 .

Tanto a isoprenalina como a terbutalina, produziram um aumento de forma dependente da concentração no efluxo de trítio induzido por estimulação nervosa, que foi observado apenas nos ratos da estirpe selvagem, mas não nos ratos PNMT-KO (Figura 4). A expressão proteica dos adrenoreceptores β_2 nas preparações totais de aorta não foi diferente nos dois grupos de animais, mas na porção membranar foi menor nos ratos PNMT-KO que na estirpe selvagem (Figura 5).

Conclusão e implicações: Os resultados obtidos são concordantes com os de Sun e colaboradores. Estes autores mostraram que a adrenalina estava ausente da glândula suprarrenal, do plasma e da urina dos ratos PNMT-KO, enquanto o conteúdo em noradrenalina das glândulas suprarrenais estava significativamente aumentado. Isto pode ser devido à acumulação de noradrenalina, a qual não pode ser metilada para formar adrenalina, devido à ausência da enzima PNMT.

Os resultados deste estudo indicam, ainda, que o relaxamento da aorta dos ratos da estirpe selvagem ocorre através da ativação de adrenoreceptores β_1 e β_2 , mas apenas os adrenoreceptores β_1 funcionam na ausência de adrenalina, o que foi verificado nos ratos PNMT-KO. Isto pode ser o motivo de em repouso a pressão arterial ser idêntica entre os grupos e durante o exercício observar-se um maior aumento da pressão arterial nos ratos PNMT-KO comparativamente aos de estirpe selvagem. Pode especular-se que esta situação ocorre em situações de stresse, como consequência de uma diminuição da

resposta vasodilatadora total devido á ausência do componente mediado pelos adrenoreceptores β_2 nos ratos PNMT-KO.

Esta foi a primeira vez que foram identificados adrenoreceptores β pré-juncionais na aorta de ratos, em particular no que respeita os adrenoreceptores β_2 . Contudo, a ativação de adrenoreceptores- β ou β_2 nos ratos PNMT-KO não alterou significativamente a libertação de noradrenalina.

Na porção da membrana da aorta dos ratos PNMT-KO observou-se uma menor expressão da proteína dos adrenoreceptores β_2 comparativamente com os ratos WT, o que poderá originar uma diminuição da atividade da ciclase do adenilato com produção de baixos níveis de AMPc, o que pode justificar a diminuição da relaxamento e da facilitação da libertação de noradrenalina quando se usam agonistas dos adreceptores β_2 . Estes resultados estão de acordo com a evolução paralela ao longo do tempo entre o aumento do teor de adrenalina na medula suprarrenal no período pós-natal, e o desenvolvimento funcional dos adrenoreceptores β_2 , conforme descrito anteriormente na veia safena canina. Além disso, existem outros dados na literatura que estão de acordo com esta hipótese. Em células sanguíneas humanas, verificou-se uma diminuição da resposta dos adrenoreceptores β nos recém-nascidos comparativamente com os adultos. Constatou-se ainda, uma ausência de vasodilatação mediada pelos adrenoreceptores β_2 na veia umbilical humana. Por outro lado, Kudlacz *et al* descobriram que o tratamento de ratos recém-nascidos com agonistas dos adrenoreceptores β_2 causava uma sensibilização surpreendente dos adrenoreceptores- β , em vez de provocar dessensibilização. Também, uma única exposição à terbutalina é capaz de induzir uma forte sensibilização da atividade da ciclase do adenilato no tronco cerebral e no cerebelo de ratos recém-nascidos. É concebível que a adrenalina, como um agonista endógeno dos adrenoreceptores β_2 possa atuar de forma semelhante.

No seu conjunto, estes resultados sustentam a hipótese de Paiva e colaboradores, de que a presença de adrenoreceptores β_2 funcionais é dependente da existência de glândulas suprarrenais que sintetizem adrenalina em elevadas concentrações, confirmando que elevados teores de adrenalina constituem o fator desencadeante direto do desenvolvimento de respostas mediadas pelos adrenoreceptores β_2 (o modelo proposto encontra-se na figura 6). Durante o stress os adrenoreceptores β ajudam a redirecionar o débito cardíaco para os tecidos que têm um aumento das necessidades de oxigénio. Assim, é concebível que, durante a resposta ao stress quando se observa uma secreção de elevadas quantidades de adrenalina, os adrenoreceptores β_2 , comparativamente aos adrenoreceptores β_1 , possam ser os mediadores mais importantes da vasodilatação. A ausência de efeitos mediados pelos adrenoreceptores β_2 em vasos sanguíneos musculares de recém-nascidos pode estar relacionado com a ausência da necessidade para reagir a acontecimentos stressantes.

Em conclusão, quando a adrenalina está ausente não se desenvolvem as respostas de vasodilatação e facilitação da libertação de noradrenalina na aorta mediada pelos adrenoreceptores β_2 , sendo que a translocação dos adrenoreceptores β_2 do meio intracelular para a membrana plasmática parece ser o alvo determinante da atuação da adrenalina. Estes resultados confirmam que a adrenalina tem um papel crucial para o desenvolvimento funcional dos adrenoreceptores β_2 . Portanto, os adrenoreceptores β_2 parecem ser mais importantes do que os adrenoreceptores β_1 no redirecionamento do débito cardíaco para os tecidos cuja necessidade de oxigénio aumenta em resposta ao stress.